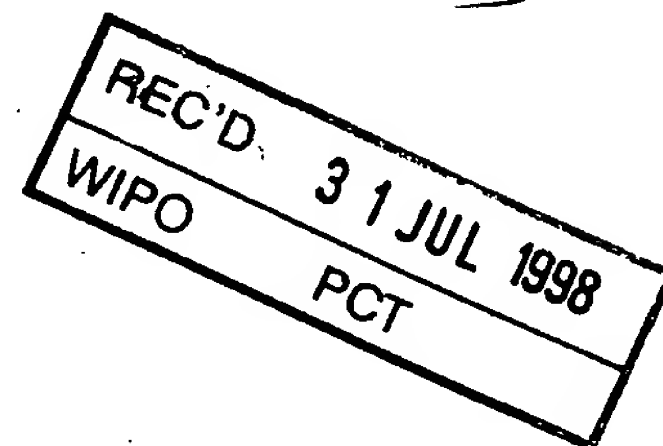


09/1424686

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**Bescheinigung**

Die Bayer Aktiengesellschaft in Leverkusen/Deutschland hat
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Humane katalytische Telomerase-Untereinheit und
deren diagnostische und therapeutische Verwen-
dung"

am 20. Juni 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 12 N, C 07 H und C 07 K der Internationalen Patent-
klassifikation erhalten.

München, den 24. März 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Wehrer

Patenzzeichen: 197 26 329.1

Humane katalytische Telomerase-Untereinheit und deren diagnostische und therapeutische Verwendung

Aufbau und Funktion der Chromosomenenden

5

Das genetische Material eukaryontischer Zellen ist auf linearen Chromosomen verteilt. Die Enden der Erbanlagen werden, abgeleitet von den griechischen Wörtern *telos* (Ende) und *meros* (Teil, Segment), als Telomere bezeichnet. Die meisten Telomere bestehen aus Wiederholungen von kurzen Sequenzen, die überwiegend aus Thymin und Guanin aufgebaut sind (Zakian, 1995). Die Telomersequenzen verwandter Organismen sind oft ähnlich und sogar zwischen phylogenetisch weiter entfernten Spezies konserviert. Bemerkenswert ist, daß in allen bislang untersuchten Wirbeltieren die Telomere aus der Sequenz TTAGGG aufgebaut werden (Meyne *et al.*, 1989).

10

15

Die Telomere üben verschiedene wichtige Funktionen aus. Sie verhindern die Fusion von Chromosomen (McClintock, 1941) und damit die Entstehung von dizentrischen Erbanlagen. Solche Chromosomen mit zwei Centromeren können durch Verlust der Heterozygotie bzw. Verdopplung oder Verlust von Genen zur Entwicklung von Krebs führen.

20

Desweiteren dienen Telomere dazu, intakte Erbanlagen von beschädigten zu unterscheiden. So stellten Hefezellen ihre Zellteilung ein, wenn sie ein Chromosom ohne Telomer enthielten (Sandell und Zakian, 1993).

25

Eine weitere wichtige Aufgabe erfüllen Telomere bei der DNA-Replikation eukaryontischer Zellen. Im Gegensatz zu den zirkulären Genomen von Prokaryonten können die linearen Chromosomen der Eukaryonten von dem DNA Polymerase-Komplex nicht vollständig repliziert werden. Zur Initiation der DNA-Replikation sind RNA-Primer notwendig. Nach Abspaltung der RNA-Primer, Verlängerung der Okazaki-Fragmente und anschließender Ligation fehlt dem neu-synthetisierten DNA-Strang das 5'-Ende, denn dort kann der RNA-Primer nicht durch DNA ersetzt werden. Ohne besondere Schutzmechanismen würden daher die Chromosomen mit jeder Zellteilung schrumpfen ("end-replication problem"; Harley *et al.*, 1990). Die nicht-kodierenden

30

Telomersequenzen stellen vermutlich eine Pufferzone dar, um dem Verlust von Genen vorzubeugen (Sandell und Zakian, 1993).

5 Darüberhinaus spielen Telomere auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der zellulären Alterung (Olovnikov, 1973). Humane somatische Zellen zeigen in Kultur eine limitierte Replikationskapazität; sie werden nach einer gewissen Zeit seneszent. In diesem Zustand teilen sich die Zellen selbst nach Stimulierung mit Wachstumsfaktoren nicht mehr, sterben aber nicht, sondern bleiben metabolisch aktiv (Goldstein, 1990).
10 Verschiedene Beobachtungen sprechen für die Hypothese, daß eine Zelle anhand der Länge ihrer Telomere bestimmt, wie oft sie sich noch teilen kann (Allsopp *et al.*, 1992).

Zusammenfassend besitzen die Telomere somit zentrale Funktionen bei der Alterung von Zellen sowie der Stabilisierung des genetischen Materials und Verhinderung von
15 Krebs.

Das Enzym Telomerase synthetisiert die Telomere

20 Wie oben beschrieben können Organismen mit linearen Chromosomen ohne einen speziellen Schutzmechanismus ihr Genom nur unvollständig replizieren. Die meisten Eukaryonten verwenden zur Regeneration der Telomersequenzen ein spezielles Enzym, die Telomerase. In den bislang untersuchten Einzellern wird Telomerase konstitutiv expremiert. Dagegen wurde in Menschen die Telomerase-Aktivität nur in Keimzellen und Tumorzellen gemessen, wogegen benachbartes somatisches Gewebe keine
25 Telomerase enthielt (Kim *et al.*, 1994).

Telomerase in Ciliaten

30 Die Telomerase wurde, wie auch die Telomere, zuerst im Ciliaten *Tetrahymena thermophila* identifiziert. Die Telomerase-Aktivität wurde durch Verlängerung des einzelsträngigen Oligonukleotides d(TTGGGG)₄ in Gegenwart von dTTP und dGTP nachgewiesen (Greider und Blackburn, 1985). Dabei wurde an den Primer wiederholt die *Tetrahymena*-Telomersequenz TTGGGG angehängt. Selbst wenn als Ausgangs-

material ein Oligonukleotid mit der unregelmäßigen Telomersequenz von *Saccharomyces cerevisiae*, T(G)₁₋₃, angeboten wurde, verlängerte die Telomerase den Primer mit der Telomersequenz von *Tetrahymena* (Greider und Blackburn, 1985). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß die Telomerase selbst die Vorlage für die Sequenz der Telomere mit sich führt.

Nachdem zunächst die Existenz einer RNA-Komponente in der Telomerase nachgewiesen werden konnte (Greider und Blackburn, 1987), wurde kurze Zeit später das Gen für die RNA-Untereinheit der Telomerase kloniert (Greider und Blackburn, 1989). Diese RNA enthält eine Region mit dem Komplement zur Telomersequenz von *Tetrahymena* (nachfolgend "Komplement-Region" genannt). Die Telomerase-Aktivität war abhängig von der RNA-Komponente, was durch Verdau der RNA mit nachfolgendem Verlust der Aktivität gezeigt werden konnte. Wurde die Telomerase-RNA in ihrer Komplement-Region mutiert, so wurden die entsprechenden Mutationen *in vivo* in die Telomere von *Tetrahymena* eingebaut (Yu *et al.*, 1990). Die Telomerase gehört demnach zur Klasse der RNA-abhängigen DNA-Polymerasen.

Die ersten Protein-Untereinheiten der *Tetrahymena*-Telomerase, p80 und p95, wurden 1995 identifiziert (Collins *et al.*, 1995). Die Beobachtung, daß p95 das Enzym an der DNA verankert und p80 die RNA-Komponente bindet, führte zu folgendem Modell: Die Telomerase-RNA lagert sich mit ihrer Komplement-Region an den einzelsträngigen 3'-Überhang an. Die Verlängerung des 3'-Überhangs geschieht durch Einbau der entsprechenden Nukleotide in 5'-3'-Richtung. Die *de novo*-Synthese von Telomeren beinhaltet wahrscheinlich einen Elongations- und einen Translokationsschritt. Ist eine Telomersequenz synthetisiert worden, bewegt sich die Telomerase vermutlich an der DNA entlang, bis sie wieder in einer Position ist, um eine vollständige Telomersequenz hinzuzufügen. Dieses Modell muß nicht allgemeingültig sein, denn zwischen Telomerasen unterschiedlicher Spezies bestehen große Unterschiede in der Anzahl der Nukleotide, die das Enzym addiert bevor es vom Telomer dissoziiert (Prowse *et al.*, 1993).

Darüberhinaus wurden kürzlich auch Telomerase-Untereinheiten anderer Organismen identifiziert. In dem Ciliaten *Euplotes aediculatus* wurden zwei Protein-Unterein-

heiten, p123 und p43, gefunden, welche keine Homologie zu den *Tetrahymena*-Telomerase-Proteinen zeigen. Die Telomerase-Untereinheit p123 weist an ihrem N-Terminus eine basische Domäne und am C-Terminus eine Domäne für eine Reverse Transkriptase (RT) auf, was auf eine katalytische Funktion dieses Proteins hindeutet (Lingner *et al.*, 1997). Darüberhinaus wurde eine signifikante Homologie von p123 zu dem von Lundblad gefundenen Protein Est2 aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Lingner *et al.*, 1997).

Während für p80 und p95 bisher keine essentielle Funktion für die Telomeraseaktivität nachgewiesen wurde, konnte für die potentiellen katalytischen Untereinheiten der Telomerase p123/est2p eindeutig eine Schlüsselfunktion aufgezeigt werden: Eine Mutation des RT-Aktivitätszentrums von est2p führte zu einer signifikanten Verkürzung der Telomere in Hefezellen (Lingner *et al.*, 1997).

15 Telomerase-Komponenten aus Säugerzellen

Inzwischen wurden die RNA-Komponenten der Telomerasen von verschiedenen Organismen, unter anderem von *Saccharomyces cerevisiae*, Mäusen und Menschen (Singer und Gottschling, 1994; Blasco *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1995), kloniert. Alle bislang bekannten Telomerase-RNAs enthalten eine Region, die komplementär zu der Telomerasequenz des jeweiligen Organismus ist. Die Primärsequenz der humanen Telomerase-RNA (hTR) weist jedoch keine Ähnlichkeiten mit den RNA-Komponenten der Ciliaten oder *Saccharomyces cerevisiae* auf. Dagegen existieren konservierte Bereiche zwischen der humanen und der murinen Telomerase-RNA (Feng *et al.*, 1995).

Vor kurzem wurde die Isolation eines humanen Telomerase-assoziiertes Proteins (hTP1) beschrieben (Harrington *et al.*, 1997). Das korrespondierende Gen wurde aufgrund seiner Homologie zu der *Tetrahymena* Telomerase Untereinheit p80 in einer nicht der Allgemeinheit zugänglichen EST Datenbank gefunden (Harrington *et al.*, 1997). hTP1 ist aus 2627 Aminosäuren zusammengesetzt und zeigt im N-Terminus drei Domänen, welche maximal zu 46% homolog zu p80 sind. Als weiteres Strukturelement konnten im C-terminalen Bereich 16 Wiederholungen aus den Aminosäuren

Tryptophan und Asparagin aufgezeigt werden, die vermutlich eine Protein-Protein Interaktion vermitteln.

Aktivierung der Telomerase in menschlichen Tumoren

5

Eine Aktivität der Telomerase konnte in Menschen ursprünglich nur in Keimbahnzellen, nicht aber in normalen somatischen Zellen (Hastie *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1994) nachgewiesen werden. Nach der Entwicklung eines sensitiveren Nachweisverfahrens (Kim *et al.*, 1994) wurde auch in hematopoietischen Zellen eine geringe Telomeraseaktivität detektiert (Broccoli *et al.*, 1995; Counter *et al.*, 1995; Hiyama *et al.*, 1995).
10 Allerdings wiesen diese Zellen trotzdem eine Reduktion der Telomere auf (Vaziri *et al.*, 1994; Counter *et al.*, 1995). Noch ist nicht geklärt, ob die Menge an Enzym in diesen Zellen nicht ausreichend für eine Kompensation des Telomerverlustes ist, oder ob die gemessene Telomerase-Aktivität von einer Subpopulation, z.B. unvollständig
15 ausdifferenzierten CD34⁺38⁺-Vorläuferzellen, herrührt (Hiyama *et al.*, 1995). Zur Klärung wäre ein Nachweis der Telomerase-Aktivität in einer einzelnen Zelle nötig.

Interessanterweise wurde jedoch in einer großen Zahl der bislang getesteten Tumorgewebe eine signifikante Telomerase-Aktivität nachgewiesen (1734/2031, 85%;
20 Shay, 1997), während in normalem somatischem Gewebe keine Aktivität gefunden wurde (1/196, <1%, Shay, 1997). Verschiedene Untersuchungen zeigten außerdem, daß in seneszenten Zellen, die mit viralen Oncoproteinen transformiert wurden, die
Telomere weiterhin schrumpften und Telomerase nur in der Subpopulation entdeckt werden konnte, die die Wachstumskrise überlebte (Counter *et al.*, 1992). In diesen
25 immortalisierten Zellen waren auch die Telomere stabil (Counter *et al.*, 1992). Ähnliche Befunde aus Untersuchungen an Mäusen (Blasco *et al.*, 1996) stützen die Annahme, daß eine Reaktivierung der Telomerase ein spätes Ereignis in der Tumorgenese ist.

30 Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine "Telomerase-Hypothese" entwickelt, die den Verlust von Telomerase-Sequenzen und Zellalterung mit der Aktivität von Telomerase und der Entstehung von Krebs verbindet. In langlebigen Spezies wie dem Menschen kann das Schrumpfen der Telomere als ein Mechanismus zur Tumorsuppression ange-

sehen werden. Ausdifferenzierte Zellen, die keine Telomerase enthalten, stellen bei einer bestimmten Länge der Telomere ihre Zellteilung ein. Mutiert eine solche Zelle, so kann aus ihr nur dann ein Tumor entstehen, wenn die Zelle ihre Telomere verlängern kann. Ansonsten würde die Zelle weiterhin Telomersequenzen verlieren, bis ihre Chromsomen instabil werden und sie schließlich zugrunde geht. Die Reaktivierung der Telomerase ist vermutlich der Hauptmechanismus von Tumorzellen zur Stabilisation ihrer Telomere.

Aus diesen Beobachtungen und Überlegungen ergibt sich, daß eine Inhibition der Telomerase eine Therapie von Tumoren erlauben sollte. Konventionelle Krebstherapien mit Zytostatika oder kurzwelligen Strahlen schädigen nicht nur die Tumorzellen, sondern alle sich teilenden Zellen des Körpers. Da aber außer Tumorzellen nur Keimbahnzellen eine signifikante Telomerase-Aktivität enthalten, würden Telomerase-Inhibitoren spezifischer die Tumorzellen angreifen und somit weniger unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen. In allen bislang getesteten Tumorgeweben wurde eine Telomerase-Aktivität nachgewiesen, so daß diese Therapeutika gegen alle Krebsarten eingesetzt werden könnten. Die Wirkung von Telomerase-Inhibitoren würde dann eintreten, wenn die Telomere der Zellen sich soweit verkürzt haben, daß das Genom instabil wird. Da Tumorzellen meist kürzere Telomere aufweisen als normale somatische Zellen, würden zuerst Krebszellen durch Telomerase-Inhibitoren eliminiert werden. Zellen mit langen Telomeren, wie die Keimzellen, würden dagegen erst viel später geschädigt werden. Telomerase-Inhibitoren stellen somit einen zukunftsweisenden Weg für die Therapie von Krebs dar.

Eindeutige Antworten auf die Frage nach der Art und den Angriffspunkten physiologischer Telomerase-Inhibitoren werden aber erst möglich sein, wenn auch die Proteinstrukturen des Enzyms mit ihren Funktionen identifiziert und die Erkenntnisse über verschiedene Telomer-bindende Proteine vertieft sind.

Die Erfindung betrifft die katalytisch aktive humane Telomerase-Untereinheit (phTC) gegebenenfalls in aufgereinigter Form, aktive Teile des Proteins, Modulatoren, insbesondere Agonisten des Proteins, die Funktion des Proteins imitierende Substanzen sowie Kombinationen aus diesen Komponenten.

Die Erfindung betrifft weiterhin:

- 5 - Die Sequenz, die für das humane Protein phTC kodiert, im einzelnen:
 - die genomische Sequenz des hTC-Gens,
 - die cDNA-Sequenz des hTC-Gens ,
 - die Sequenz der mRNA, die vom hTC Gen transkribiert wird,
 - 10 - Teile aus den oben genannten Sequenzen, darunter die in der Abbildung 1 gezeigte DNA Sequenz von hTC.
- Die Sequenzen, die in anderen Säugern für dem hTC homologe Proteine kodieren, im einzelnen:
 - 15 - die genomischen Sequenzen hTC-homologer Gene,
 - die cDNA-Sequenzen hTC-homologer Gene,
 - die Sequenzen der mRNAs, die von hTC-homologen Genen transkribiert werden,
 - Teile aus den oben genannten Sequenzen.
- 20 - Sequenzen, die für dem Protein phTC verwandte Proteine im Menschen und anderen Säugern kodieren, im einzelnen:
 - 25 - die genomischen Sequenzen hTC-verwandter Gene in Mensch und anderen Säugern,
 - die cDNA-Sequenzen hTC-verwandter Gene in Mensch und anderen Säugern,
 - die Sequenzen der mRNAs, die von hTC-verwandten Genen transkribiert werden in Mensch und anderen Säugern,
 - 30 - Teile aus den oben genannten Sequenzen.
- Das oben beschriebene phTC Protein, isoliert aus Säugerzellen.

- Das phTC Protein, markiert mit einem Nachweis-Reagenz, wobei das Nachweis-Reagenz bevorzugt ein Enzym, ein radioaktiv markiertes Element oder eine fluoreszierende Chemikalie ist.

- 5
- Einen Antikörper, der gegen das phTC Protein gerichtet ist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist dies ein polyklonaler Antikörper.

- 10
- Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist dies ein monoklonaler Antikörper.

- 15
- Solche Antikörper können beispielsweise produziert werden durch die Injektion eines substantiell immunkompetenten Wirts mit einer für die Antikörper-Produktion effektiven Menge eines phTC Polypeptids oder eines Fragments davon und durch nachfolgende Gewinnung dieses Antikörpers.

- 20
- Weiterhin läßt sich in an sich bekannter Weise eine immortalisierte Zelllinie erhalten, die monoklonale Antikörper produziert.

- 25
- Die Antikörper können gegebenenfalls mit einem Nachweisreagenz markiert sein.

- 30
- Anstelle des vollständigen Antikörpers können auch Fragmente eingesetzt werden, die die gewünschten spezifischen Bindungseigenschaften besitzen.

Bevorzugte Beispiele für ein solches Nachweis-Reagenz sind Enzyme, radioaktiv markierte Elemente, fluoreszierende Chemikalien oder Biotin.

- 35
- Oligonukleotide in aufgereinigter Form mit einer Sequenz, die identisch oder exakt komplementär ist zu einer 10 bis 500 Nukleotide langen, zusammenhängenden Sequenz der oben beschriebenen genomischen DNA, cDNA oder mRNA.

Ein solches Oligonukleotid kann insbesondere ein Oligodesoxyribonucleotid oder ein Oligoribonucleotid oder eine Peptidnukleotidsäure (PNA) sein

5 Bevorzugt sind Oligonukleotide, welche die Aktivität der Telomerase inhibieren, reprimieren oder blockieren, wenn sie an die hTC mRNA binden.

- Eine DNA Sequenz oder eine degenerierte Variation dieser Sequenz, die das Protein phTC oder ein Fragment dieses Proteins kodiert, gegebenenfalls enthaltend die DNA Sequenz aus Abbildung 1, oder DNA Sequenz, die mit der vorgehend aufgeführten DNA Sequenz unter Standard-Hybridisierungsbedingungen hybridisiert.

10

- Ein rekombinantes DNA Molekül, das eine DNA Sequenz oder eine degenerierte Variation dieser Sequenz beinhaltet, die phTC oder ein Fragment von phTC kodiert, wobei letztere Sequenz bevorzugt die DNA Sequenz aus Abbildung 1 enthält, oder das eine solche DNA Sequenz beinhaltet, die mit der vorgehend aufgeführten DNA Sequenz unter Standard-Hybridisierungsbedingungen hybridisiert.

15

20 Bevorzugt ist in dem oben genannten rekombinanten DNA Molekül die beschriebene DNA mit einer Expressions-Kontrollsequenz verbunden.

25 Besonders bevorzugt als Expressions-Kontrollsequenz sind z.B. der frühe oder späte Promotor des SV40- oder Adenovirus, das lac System, das trp System, das TAC System, das TRC System, die Haupt-Operator- und Promotorregionen des Phagen λ , die Kontrollregionen des fd Hüllproteins, der Promotor der 3-Phosphoglycerat Kinase, der Promotor der Sauren Phosphatase und der Promotor des α -Mating Faktors der Hefe.

30 - Einen einzelligen Wirt, der mit einem oben beschriebenen rekombinanten DNA Molekül transformiert wurde, das die DNA Sequenz oder eine degenerierte

Variante dieser Sequenz enthält, die für das phTC Protein oder einen Teil dieses Protein kodiert. In diesem rekombinanten DNA-Molekül ist die besagte DNA Sequenz mit einer Expressions-Kontrollsequenz verknüpft.

- 5 Bevorzugte Beispiele für den einzelligen Wirt sind: *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, yeasts, CHO, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 und BMT10 Zellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Säugerzellen in Zellkultur.
- 10 - Einen rekombinanten Virus, der mit einem der vorstehend beschriebenen DNA Moleküle oder einem Derivat oder Fragment dieses Moleküls transformiert wird.
- 15 - Eine Methode zur Inhibition der Telomeraseaktivität in humanen Zellen, bevorzugt neoplastische Zellen, bei der ein exogenes Polynukleotid in die Zellen transferiert wird, das aus einer Transkriptionseinheit besteht. Diese Transkriptionseinheit beinhaltet eine Polynukleotidsequenz aus mindestens 29 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die substantiell identisch oder substantiell komplementär zur hTC RNA Sequenz ist und die mit einer heterologen Transkriptions-regulatorischen Sequenz verknüpft ist, die die Transkription des verknüpften Polynukleotids in besagten Zellen steuert.
- 20 Bevorzugt enthält die oben genannte heterologe Transkriptions-regulatorische Sequenz einen Promotor, der in humanen Zellen konstitutiv aktiv ist.
- 25 Alternativ kann die heterologe Transkriptions-regulatorische Sequenz einen Promotor enthalten, der in humanen Zellen durch Zugabe einer regulatorischen Substanz induziert oder reprimiert werden kann. Dazu zählen beispielsweise induzierbare und reprimierbare Tetrazyklin-abhängige Promotoren, Heat-shock-Promotoren, Metallionen-abhängige Promotoren.
- 30

Das obengenannte exogene Polynukleotid kann beispielsweise ein virales Genom mit einer Transkriptionseinheit aus der humanen hTC DNA-Komponente sein.

5 Besonders bevorzugt produziert die besagte Transkriptionseinheit antisense RNA, die substantiell komplementär zur humanen hTC RNA-Komponente ist.

Weiterhin besonders bevorzugt kann das exogene Polynukleotid die Sequenz aus Abb. 1 enthalten.

10

- Ein Polynukleotid für die Gentherapie einer menschlichen Krankheit. Dieses Polynukleotid besteht aus einer Transkriptionseinheit, die eine Polynukleotidsequenz aus mindestens ~~29~~³ aufeinanderfolgenden Nukleotiden enthält, die substantiell identisch oder substantiell komplementär zur hTC RNA Sequenz ist und die mit einer heterologen Transkriptions-regulatorischen Sequenz verknüpft ist, die die Transkription des verknüpften Polynukleotids in besagten Zellen steuert.

15

- Eine Methode zur Detektion Telomerase-assoziiierter Zustände in einem Patienten, die folgende Schritte umfaßt:

20

- A. Detektion des phTC Proteins in Körperflüssigkeiten oder zellulären Proben, um einen diagnostischen Wert zu erhalten;
- B. Vergleich des diagnostischen Werts mit Standardwerten für das phTC Protein in standardisierten normalen Zellen oder Körperflüssigkeiten des gleichen Typs wie die Testprobe;
- C. Detektion diagnostischer Werte, die höher oder niedriger als Standardvergleichswerte liegen, indizieren einen Telomerase-assoziierten Zustand, der wiederum einen pathogenen Zustand indiziert.

25

30

Bevorzugt wird diese Methode eingesetzt zur Detektion einer neoplastischen Erkrankung eines Patienten. Die Methode umfaßt dann folgende Schritte:

- 5
- A. Detektion des phTC Proteins in zellulären Proben, um einen diagnostischen Wert zu erhalten;
 - B. Vergleich des diagnostischen Werts mit Standardwerten für das phTC Protein in nicht-neoplastischen Zellen des gleichen Typs wie die Testprobe;
 - C. Diagnostische Werte, die deutlich höher als Standardvergleichswerte liegen, indizieren einen neoplastischen Zustand.
- 10
- Eine Methode zur Bestimmung der Gegenwart des phTC Proteins in einer Zelle oder zellulären Probe, die auf der Amplifikation eines hTC-Polynukleotids oder Hybridisierung eines hTC-Polynukleotids, Primers oder einer hTC komplementären Sequenz mit einem hTC Polynukleotid beruhen.
- 15
- Ein Testkit zum Nachweis von phTC in zellulären Proben und Körperflüssigkeiten, wobei markierte, immunchemisch-reaktive Komponenten beispielsweise sein können: polyklonale Antikörper gegen phTC, monoklonale Antikörper gegen phTC, Fragmente dieser Antikörper oder einem Gemisch aus diesen Komponenten.
- 20
- Eine Methode zur Verhinderung und/oder Behandlung zellulärer (Zer-) Störung und/oder Fehlfunktion und/oder anderer Krankheitsbilder im Menschen, die auf der Gabe einer therapeutisch effektiven Menge an katalytisch aktiver humaner Telomerase, ihrer funktionellen Äquivalente oder ihrer katalytisch aktiven Fragmente beruht. Ebenfalls denkbar ist der Einsatz einer Substanz,
- 25
- die die Produktion und/oder Aktivität von phTC fördert; eine Substanz, die die Aktivität von phTC imitieren kann; einer Substanz, die die Produktion und/oder Aktivität von phTC inhibieren kann oder eines Gemisches dieser Substanzen. Weiterhin kann ein spezifischer Bindungspartner eingesetzt werden.
- 30
- Bevorzugt wird die Methode eingesetzt zur Verhinderung oder Behandlung der Alterung oder von Krebserkrankungen.

- Eine antisense-Nukleinsäure gegen die hTC mRNA, die eine Nukleotidsequenz enthält, die mit besagter mRNA hybridisiert, wobei die antisense-Nukleinsäure eine RNA oder eine DNA ist.
- 5 Bevorzugt bindet die antisense-Nukleinsäure an das Start-Kodon der jeweiligen mRNAs.
- Ein rekombinantes DNA Molekül mit einer DNA Sequenz, von der bei der Transkription eine antisense-Ribonukleinsäure gegen die hTC mRNA produziert wird. Diese besagte antisense-Ribonukleinsäure enthält eine Nukleinsäuresequenz, die mit der besagten hTC mRNA hybridisieren kann.
- 10
- Ein solches DNA-Molekül kann zur Herstellung einer Zelllinie mit reduzierter Expression von phTC eingesetzt werden, indem man eine phTC-produzierende Zelllinie mit diesem rekombinanten DNA Molekül transfiziert.
- 15
- Ein Ribozym, das die hTC mRNA spaltet.
- Bevorzugt ist dies ein *Tetrahymena*-Typ Ribozym oder ein Hammerhead-Typ Ribozym.
- 20
- Ein rekombinantes DNA Molekül mit einer DNA Sequenz, deren Transkription zur Produktion eines solchen Ribozyms führt.
- 25 Dieses rekombinante DNA-Molekül kann eingesetzt werden um eine phTC-produzierende Zelllinie zu transfizieren.
- Eine Zusammenstellung, bestehend aus einem Paar von humanen hTC Polynukleotid-PCR Primern, wobei die Primer bevorzugt aus Sequenzen bestehen, die mit der Sequenz der humanen hTC mRNA korrespondieren oder zu dieser Sequenz komplementär sind.
- 30

- Eine Zusammenstellung, die eine Polynukleotid-Hybridisierungssonde für das humane hTC Gen enthält, wobei die Sonde bevorzugt mindestens ⁹29 aufeinanderfolgende Nukleotide enthält, die mit der Sequenz des humanen hTC Gens korrespondieren oder zu dieser komplementär sind.

5

- Tiermodelle, mit denen die Telomerase/Telomer-Regulation *in vivo* untersucht werden kann. So können z.B. mit Knockout- oder transgenen Tieren Tumorentstehung und Alterung direkt untersucht werden.

10

Funktionelle Äquivalente sind im Fall von Proteinen oder Peptiden solche Verbindungen, die sich zwar hinsichtlich der Aminosäuresequenz unterscheiden können, aber im wesentlichen dieselben Funktionen haben.

15

Bekannte Beispiele hierfür sind Isoenzyme bzw. sogenannte Mikroheterogenitäten bei Proteinen.

20

Im Fall der Oligo- oder Polynucleinsäuren sollten unter funktionellen Äquivalenten solche Verbindungen verstanden werden, die sich in der Nucleotid-Sequenz unterscheiden, aber für das selbe Protein codieren. Dies ist z.B. auf den degenerierten genetischen Code zurückzuführen.

Erläuterung der Abbildungen:

25

Fig. 1, Abb. 1: Partielle cDNA Sequenz der humanen katalytischen Telomerase-Untereinheit (hTC).

Die Abbildung zeigt die in der EST-Datenbank verfügbare Teilsequenz der hTC cDNA

30

Fig. 1, Abb. 2: Abgeleitete Aminosäuresequenz von der in Abb.1 dargestellten hTC DNA Sequenz.

Die gesamte in Abb. 1 dargestellte DNA Sequenz läßt sich vollständig in eine Aminosäuresequenz translatieren. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt.

Fig. 2: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* p123 (p123) und Mensch (phTC).

Die Bedingungen (Ktuple, Gap Penalty und Gap Length Penalty) für den in dieser Abbildung dargestellten Lipman-Pearson Protein Vergleich mit der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc.), sind aufgelistet. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen p123 von *Euplotes aediculatus* und dem identifizierten EST-Klon (phTC) identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben. Nicht identische, aber in der Funktion ähnliche oder vergleichbare Aminosäuren sind durch ein : gekennzeichnet.

Fig. 3: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* p123 (p123), und Hefe (est2p).

Die Bedingungen (Ktuple, Gap Penalty und Gap Length Penalty) für den in dieser Abbildung dargestellten Lipman-Pearson Protein Vergleich mit der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc.) sind aufgelistet. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen p123 von *Euplotes aediculatus* und est2p von Hefe identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben. Nicht identische, aber in der Funktion ähnliche oder vergleichbare Aminosäuren sind durch ein : gekennzeichnet.

Fig. 4: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von Hefe (est2p) und Mensch (phTC).

Die Bedingungen (Ktuple, Gap Penalty und Gap Length Penalty) für den in dieser Abbildung dargestellten Lipman-Pearson Protein Vergleich mit der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc.) sind aufgelistet. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen est2p von Hefe und dem identifizierten EST-Klon (phTC) identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Ein-

buchstabencode hervorgehoben. Nicht identische, aber in der Funktion ähnliche oder vergleichbare Aminosäuren sind durch ein : gekennzeichnet.

5 Fig. 5: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* p123 (p123), Hefe (est2p) und Mensch (phTC).
 Der in der Fig. 5 dargestellte Vergleich zwischen *Euplotes* p123 (p123), Hefe (est2p) und Mensch (phTC) wurde mit dem Clustal Method Subprogramm der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc) unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen est2p von Hefe, p123 von *Euplotes aediculatus* und dem identifizierten EST-Klon (phTC) identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben. Zusätzlich sind die Bereiche, die zwischen allen drei Proteinen identisch sind, durch einen hellgrauen Balken oberhalb der Proteinsequenz gekennzeichnet.

Fig. 6: Detailausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* p123 (p123), Hefe (est2p) und Mensch (phTC).
 20 Die Anlage zeigt einen Ausschnitt aus dem Proteinsequenzvergleich der Fig. 5 der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* p123 (p123), Hefe (est2p) und Mensch (phTC). Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Identische Aminosäuren sind fett gedruckt (Abb. 3 und 4). In der Konsensussequenz für das Reverse Transkriptase (RT con)-Motiv steht h für eine hydrophobe Aminosäure und p bezeichnet eine polare Aminosäure (Abb. 4).

Fig. 7: Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel mit unterschiedlich vorbehandelter phTC DNA.
 30 Die Abbildung zeigt ein Ethidiumbromid-gefärbtes 0.8%iges Agarosegel. In den Spuren 1 und 8 sind zwei verschiedene DNA Größenstandards aufgetragen, wobei die DNA Fragmentlängen 3, 2, 0.5 und 0.4 kb hervorgehoben sind. Die hTC cDNA in pT7T3D wurde mit den Restriktionsenzymen Eco RI /Not I

5

(Spur 3), Pst I (Spur 6) und Xho I (Spur 7) verdaut. Auf die Spur 2 wurde unverdaute DNA von hTC cDNA in pT7T3D aufgetragen. In den Spuren 4 und 5 wurde 1/10 eines PCR-Ansatzes (1 Minute 94°C, 2 Minuten 60°C, 3 Minuten 72°C) mit der hTC cDNA in pT7T3D und den Primern 1 (5' GAGTGTGTACGTC-GTCGAGCTGCTCAGGTC 3') und 4 (5' CACCCTCGAGGTGAGACGCTCGGCC 3') [Spur 4] bzw. mit den Primern 6 (5' GCTCGTAGTTGAGCACGCTGAACAGTG 3') und 7 (5' GCCAAGTTCCTGCACTGGCTGATGAG 3') [Spur 5] appliziert.

Beispiele

Beispiel 1

5 Es wird heute angenommen, daß weniger als 5 % des humanen Genoms tatsächlich transkribiert und in Protein translatiert werden. Durch die gezielte Untersuchung dieser kodierenden Genomanteile könnten bereits vor der kompletten Sequenzierung des Genoms wichtige Informationen über die 60 000 - 70 000 Gene in einer humanen Zelle gewonnen werden. Die Automatisierung der Hochdurchsatz-DNA-Sequenzier-
10 technologie in den letzten 10 bis 15 Jahren ermöglichte es, viele cDNA's aus Plasmid cDNA-Bibliotheken unterschiedlichsten Ursprungs zu sammeln und das jeweilige 5'- bzw. 3'-Ende zu sequenzieren. Diese typischerweise 300 bis 400 bp kurzen DNA-Sequenzen werden „Expressed SequenTags“ oder kurz ESTs genannt und sind in verschiedenen spezialisierten Datenbanken zusammengefasst. Der EST-Ansatz wurde
15 zuerst von Okubo *et al.* (1992) beschrieben und von Adams *et al.* (1992) auf einen größeren Maßstab übertragen. Gegenwärtig sind etwa 50 000 Gene aus humanen Zellen teilweise sequenziert und als EST-Eintragung dokumentiert.

20 Durch den Vergleich mit DNA- und Aminosäuresequenzen bekannter Gene können verwandte, aber bislang unbekannte Gene in diesen EST-Datenbanken identifiziert werden (Gerhold and Caskey, 1996). Ein Suchalgorithmus, der sich hierfür besonders bewährt hat, ist das tBLASTn (Altschul *et al.*, 1990). Dieser Algorithmus translatiert jeden DNA-Klon in der EST-Datenbank in alle sechs möglichen Leserahmen und vergleicht diese Aminosäuresequenzen mit der bekannten Proteinsequenz.

25 Mit der kürzlich publizierte Proteinsequenz für die katalytische Telomerase-Untereinheit aus *Euplotes aediculatus*, p123 (Lingner *et al.*, 1997), wurde die EST-Datenbank am National Center for Biotechnology Information (NCBI) durchsucht. Als Resultat wurde ein humaner EST-Klon identifiziert, der im Leserahmen +1 eine signifi-
30 kante Homologie zu p123 aufweist.

Die Homologie zwischen p123 und dem neuen Protein aus der EST-Datenbank ist am auffälligsten in zwei Sequenzbereichen, die durch 30 Aminosäuren getrennt sind. Der

5 längere Sequenzbereich, der sich bei p123 von Aminosäure 438 bis 484 erstreckt, ist zu 38% identisch zu dem korrespondierenden Bereich im gefundenen EST-Klon. Werden auch ähnliche Aminosäuren berücksichtigt, liegt die Übereinstimmung sogar bei 59%. Der zweite Homologieblock erstreckt sich im p123-Protein von Aminosäure 513 bis 530 und weist eine 44%ige Identität zu dem entsprechenden Sequenzabschnitt im neuen EST-Klon auf. Unter Berücksichtigung von Aminosäureresten mit ähnlichen Eigenschaften, findet sich eine Überstimmung von 61%.

10 Ein wichtiger Parameter zur Beurteilung einer BLAST-Suche ist der Wert P (Probability). P gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein spezifisches Segmentpaar auch in einer BLAST-Suche mit einer Zufallssequenz gefunden würde und bewegt sich numerisch zwischen 0 (Resultat hoch signifikant) und 1 (Ergebnis ohne Bedeutung). So verlief z.B. der Vergleich des p123 Äquivalents aus Hefe (est2p) mit der NCBI-EST-Datenbank negativ: Der gefundene EST-Klon hatte eine Wahrscheinlichkeit von P=1 (Tab. 1). Dagegen weist das humane Telomerase assoziierte Protein 1 (hTP1), das in einer der Allgemeinheit nicht zugänglichen EST-Datenbank gefunden wurde (Harrington *et al*, 1997), eine Wahrscheinlichkeit von P=0.004 auf.

bekanntes Gen (Spezies)	P	identifiziertes Gen	Ursprung der cDNA Bi- bliothek
est2p (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	0.999	Ratten EST-Klon	Niere
p80 (<i>Tetrahymena termophila</i>)	0.004	hTP1 (Harrington <i>et al</i> , 1997)	Krypten des Darmepithels
p123 (<i>Euplotes aediculatus</i>)	$3.5 \cdot 10^{-06}$	hTC	Keimzentren der Tonsillen

20 Tab. 1: Vergleich dreier tBlastn-Suchläufe mit verschiedenen bekannten Genen.

Der durch den Vergleich mit p123 identifizierte humane EST-Klon hat eine Wahrscheinlichkeit von $P=3.5 \times 10^{-06}$.

Diese Daten legen nahe, daß der identifizierte EST-Klon aller Wahrscheinlichkeit nach für die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase kodiert. Daher wird das korrespondierende Gen im folgenden mit hTC und das abgeleitete Protein mit phTC abgekürzt.

5

Beispiel 2

Der durch den Vergleich mit p123 identifizierte EST-Klon wurde am 2. April 1997 in die EST-Datenbank eingespeist und ist in keiner Zeitschrift publiziert. Die cDNA-Bibliothek, in welcher dieser EST-Klon vorliegt, wurde laut Angaben des National Center for Biotechnology Information wie folgt hergestellt:

10

Nach Präparation der mRNA aus den Keimzentren der Tonsillen wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt und die doppelsträngigen cDNA-Fragmente gerichtet über die Restriktionsenzymstellen Not I und Eco RI in den Vektor pT7T3D-Pac kloniert.

15

Die Sequenzierung der in die EST-Datenbank eingespeisten 389 bp erfolgte über den -28m13 rev2-Primer der Firma Amersham (DNA-Sequenz siehe Fig. 1, Abb. 1).

20

Unter Verwendung der Lasergene Programmsoftware (Dnastar Inc.) wurde die in Fig. 1, Abb. 1 gezeigte DNA-Sequenz von hTC entsprechend des humanen genetischen Codes translatiert. Dabei ergab sich ein offener Leserahmen mit der in Fig. 1, Abb. 2 gezeigten Aminosäuresequenz.

25

Die abgeleitete Proteinsequenz setzt sich aus 129 Aminosäuren zusammen, darunter 27 basische, 11 saure, 51 hydrophobe und 28 polare Aminosäurereste.

30

Der in Beispiel 1 identifizierte EST-Klon (~~Accession~~ ^{Accession} Number: AA ~~281246~~ ²⁸¹²⁹⁶) wurde kommerziell von der Research Genetics, Inc. (Huntsville) erworben und experimentell analysiert:

Wie in dem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel der Fig. 7 gezeigt, wird nach Restriktionsverdau der hTC cDNA in dem Vektor pT7T3D ein etwa 2,2 kb großes Fragment freigesetzt. Anhand einer parallel durchgeführten Polymeraseketten- (PCR) -Reaktion mit spezifischen internen Primern konnte gezeigt werden, daß die in Abb. 1
5 der Anlage 2 gezeigte Sequenz in diesen 2200 bp enthalten ist: Die Länge der erwarteten PCR Produkte liegt bei 325 und 380 bp und stimmt mit der Länge der experimentell gefundenen Fragmente überein (vergl. Spur 4 und 5 in Fig.7). Damit konnte gezeigt werden, daß die Sequenz aus der Abb. 1 der Fig. 1 in dem 2200bp-Fragment enthalten ist, und somit der vom Research Genetics, Int. (Huntsville) zugesandte
10 E.coli-Klon den identifizierten EST-Klon als Plasmid beinhaltet.

Beispiel 3

Im tBLASTn Vergleich wird nur der Bereich mit der höchsten Übereinstimmung zwischen p123 und hTC gezeigt (Aminosäuren 438-530), wogegen die dazwischenliegenden 30 Aminosäuren nicht berücksichtigt werden. Um Aussagen über die Verwandtschaft der Proteinsequenzen über einen größeren Gesamtbereich (Aminosäuren 437-554) zu treffen, wurde ein „Lipman-Person Protein Vergleich“ durchgeführt (siehe Fig. 2). Hierbei wurden 34% identische Aminosäuren bzw. 59% Aminosäuren,
15 die entweder identisch oder biochemisch ähnlich sind, gefunden. Dieses Ergebnis zeigt, daß sich auch außerhalb der mit dem tBLASTn gefundenen Homologiebereiche die Verwandtschaft zwischen diesen Proteinen fortsetzt.
20

Wie kürzlich berichtet (Lingner *et al.*, 1997) sind p123 aus *Euplotes aediculatus* und est2p aus *Saccharomyces cerevisiae* zueinander homolog. Um den Grad der Verwandtschaft zwischen p123 und est2p ins Verhältnis zu der hier beschriebenen Homologie zwischen p123 und phTC zu stellen, wurde die oben beschriebene Region von p123 (Aminosäuren 437-554) mit Hilfe des Lipman-Pearson Protein Vergleichs unter Verwendung identischer Parameter auch mit est2p verglichen. Dabei zeigte sich, daß
25 p123 und est2p in diesem ausgewählten Bereich zu 21% identisch sind bzw. 22% identische Aminosäuren oder biochemisch ähnliche Aminosäurereste aufweisen (siehe Fig. 3). Demnach ist die Homologie zwischen dem neu identifizierten hTC-Protein und dem p123 von *Euplotes* signifikant höher als zwischen p123 und est2p.
30

Beispiel 4

Die Homologie von p123 zu phTC und est2p legt die Schlußfolgerung nahe, daß alle
5 3 Proteine zur gleichen Proteinfamilie gehören. Um diese Annahme zu bestätigen,
wurde est2p unter den in Beispiel 3 erwähnten Bedingungen mit phTC verglichen
(siehe Fig. 4). Dabei zeigte sich, daß phTC zu 20% identisch ist zu est2p, also eine
vergleichbare Homologie wie p123 zu est2p aufweist. Diese vergleichsweise geringe
Übereinstimmung bestätigt auch den Befund, daß in der tBLASTn-Suche mit est2p
10 kein signifikanter EST-Klon identifiziert wurde (siehe Beispiel 1).

Beispiel 5

Um für die Proteinfamilie der katalytischen Telomerase-Untereinheiten aus verschie-
15 denen Spezies wichtige, unter Umständen funktionelle Domänen, zu identifizieren,
wurde ein Computervergleich mit p123, est2p und phTC durchgeführt (siehe Fig. 5).
Bei dieser Analyse fallen insbesondere zwei Bereiche auf, die in allen drei Proteinen
enthalten sind (siehe Fig. 5). Dem Bereich, der bei p123 den Aminosäuren 447 bis 460
entspricht (Fig. 6, Abb. 3) kann gegenwärtig keine eindeutige Funktion zugeordnet
20 werden. Eine Motiv-Suche mit dem „Wisconsin Sequence Analysis Package“ von der
„Genetics Computer Group“ (GCG) und eine Suche in einer Protein-Datenbank
(Swissprot, Ausgabe vom 8.6.1997) ergaben keine signifikanten Erkenntnisse.

Dagegen weist ein zweiter zwischen p123, est2p und phTC homologer Bereich, der
25 bei p123 den Aminosäuren 512-526 entspricht, ein Konsensus-Motiv für eine Reverse
Transkriptase (RT) auf (Fig. 6, Abb. 4). Lingner *et al* (1997) konnten zeigen, daß
p123/est2p insgesamt 6 solcher RT-Motive enthalten, die für die katalytische Funk-
tion von p123/est2p essentiell sind. Wie in Fig. 6, Abb. 4 dargestellt, sind in der bis-
lang untersuchten Sequenz von phTC auch zwei solcher RT-Motive konserviert.
30 Hierbei handelt es sich um die RT-Motive, welche bei p123/est2p am weitesten N-
terminal lokalisiert sind (Lingner *et al*, 1997).

Die Primärsequenzen von Reversen Transkriptasen sind stark divergent; nur wenige Aminosäuren sind innerhalb eines separaten Motivs vollständig konserviert (Poch *et al*, 1989 und Xiong and Eickbush, 1990). Außerdem unterscheiden sich Reverse Transkriptasen, die von Retroviren oder Long Terminal Repeat (LTR) Retroposons kodiert werden, durch verschiedene Abstände zwischen den konservierten RT-Motiven von solchen Reversen Transkriptasen, die von Nicht-LTR Retroposons oder der Gruppe II Introns kodiert werden (Xiong and Eickbush, 1990). Entsprechend des Aufbaus ihrer RT-Motive sind p123, est2p und phTC letzterer RT-Gruppe zuzuordnen. Interessanterweise entsprechen dabei die Konsensussequenzen der RT-Motive in phTC am genauesten dem postulierten RT-Konsensus-Motiv: Von acht-Aminosäureresten innerhalb der zwei RT-Motive sind bei phTC 6, bei p123 und est2p hingegen nur 5 Aminosäuren zu finden (Fig. 6, Abb. 4). Auffällig sind hierbei insbesondere die hydrophoben Aminosäuren wie Leucin und Isoleucin sowie die Aminosäuren Lysin und Arginin in bestimmten Positionen.

15

Zusammenfassend konnte hiermit auf deskriptiver Ebene gezeigt werden, daß der aufgrund seiner Homologie zu p123 identifizierte EST-Klon hTC die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase darstellt.

Literaturverzeichnis

- 5 Adams, M.D., Dubnick, M., Kerlavage, A.R., Moreno, R., Kelley, J.M., Utterback, T.R., Nagle, J.W., Fields, C. und Venter, J.C. (1992). Sequence identification of 2.375 human brain genes. Nature 355: 632-634.
- 10 Allsopp, R. C., Vazire, H., Pattersson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W. und Harley, C.B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 10114-10118.
- 15 Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. *et al.* (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.
- Blasco, M. A., Rizen, M., Greider, C. W. und Hanahan, D. (1996). Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multistage tumorigenesis. Nature Genetics 12, 200-204.
- 20 Broccoli, D., Young, J. W. und deLange, T. (1995). Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 9082-9086.
- Collins, K., Kobayashi, R. und Greider, C. W. (1995). Purification of Tetrahymena telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. Cell 81, 677-686.
- 25 Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G. Greider, C.W. Harley, C. B. und Bacchetti S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. EMBO J. 11, 1921-1929.
- Counter, C. M., Gupta, J., Harley, C. B., Leber, B. und Baccetti, S. (1995). Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. Blood 85, 2315-2320.
- 30 Feng, J., Funk, W. D., Wang, S.-S., Weinrich, S. L., Avilion, A.A., Chiu, C.-P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J., Le, S., West, M.D., Harley, C.B., Andrews, W.H., Greider, C.W. und Villeponteau, B. (1995). The RNA component of human telomerase. Science 269, 1236-1241.
- 35 Gerhold, D. und Caskey, T. (1996). It's the genes! EST access to human genome content. BioEssays 18, 973-981.

- Goldstein, S. (1990). Replicative senescence: The human fibroblast comes of age. *Science* **249**, 1129-1133.
- 5 Greider, C. W. und Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43**, 405-413.
- Greider, C. W. und Blackburn, E. H. (1987). The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**, 887-898.
- 10 Greider, C. W. und Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**, 331-337.
- Harley, C. B., Futcher, A. B. und Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460.
- 15 Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Amgen EST Program, Bass, M.B., Arruda, I. und Robinson, M.O. (1997). A mammalian telomerase-associated protein. *Science* **275**: 973-977.
- 20 Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D.K. und Allshire, R.C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* **346**, 866-868.
- Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, M., Hiyama, E., Piatyszek, M.A., Shay, J.W., Ishioka, S. und Yamakido, M. (1995). Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* **155**, 3711-3715.
- 25 Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C. B., West, M.D., Ho, P.L.C., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. und Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**, 2011-2015.
- 30 Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V. und Cech T.R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **276**: 561-567.
- Lundblad, V. und Szostak, J. W. (1989). A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**, 633-643.
- 35 McClintock, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**, 234-282.

- Meyne, J., Ratliff, R. L. und Moyzis, R. K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 7049-7053.
- 5 Okubo, K., Hori, N., Matoba, R., Niiyama, T., Fukushima, A., Kojima, Y. and Matsubra, K. (1992). Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. Nature Genetics 2: 173-179.
- Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. J. Theor. Biol. 41, 181-190.
- 10 Poch, O., Sauvaget, L., Delarue, M. und Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. EMBO J. 8: 3867-3874.
- Prowse, K. R., Avilion, A. A. und Greider, C. W. (1993). Identification of a nonprocessive telomerase activity from mouse cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 1493-1497.
- 15 Sandell, L. L. und Zakian, V. A. (1993). Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery and chromosome loss. Cell 75, 729-739.
- 20 Shampay, J. und Blackburn, E. H. (1988). Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 534-538.
- Shay, J. W. (1997). Telomerae and Cancer. Ciba Foundation Meeting: Telomeres and Telomerase. London.
- 25 Singer, M. S. und Gottschling, D. E. (1994). *TLC1*: Template RNA Component of *Saccharomyces cerevisiae* Telomerase. Science 266, 404-409.
- Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C.B. und Landsdorp, P.M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 9857-9860.
- 30 Xiong, Y. und Eickbush, T.H. (1990). Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. EMBO J. 9: 3353-3362.
- 35 Yu, G.-L., Bradley, J. D., Attardi, L. D. und Blackburn, E. H. (1990). *In vivo* alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs. Nature 344, 126-132.

Zakian, V. A. (1995). Telomeres: Beginning to understand the end. *Science* 270, 1601-1607.

Patentansprüche

1. Katalytisch aktive humane Telomerase-Untereinheit, ihre funktionellen Äqui-
valente und ihre katalytisch aktiven Fragmente.
- 5 2. Telomerase gemäß Anspruch 1, enthaltend die Aminosäuresequenz gemäß
Abb. 2 oder deren funktionelle Äquivalente.
- 10 3. Nucleinsäuresequenzen codierend für Verbindungen gemäß den Ansprüchen 1
und 2 und ihre funktionellen Äquivalente.
4. Nucleinsäuresequenzen gemäß Anspruch 3, enthaltend die DNA-Sequenz aus
Abb. 1 oder ihre funktionellen Äquivalente.
- 15 5. Antisense Nucleinsäuren bindend an die DNA gemäß Anspruch 3 oder 4.
6. Antikörper gegen Telomerase gemäß den Ansprüchen 1 und 2, gegebenenfalls
markiert mit einem oder mehreren Markern.
- 20 7. Verwendung von Nucleinsäuresequenzen gemäß den Ansprüchen 3 und 4 zur
Herstellung von Telomerase.
8. Verwendung von Antikörpern gemäß Anspruch 6 zur Diagnose.
- 25 9. Verwendung von Antikörpern gemäß Anspruch 6 zur Herstellung von
Arzneimitteln.
10. Vektor enthaltend die DNA gemäß Anspruch 3 und 4.
- 30 11. Mikroorganismen enthaltend den Vektor gemäß Anspruch 10.
12. Screening Assay zur Auffindung von Modulatoren der humanen Telomerase
enthaltend die Telomerase gemäß den Ansprüchen 1 und 2.

13. Verfahren zur Herstellung der Telomerase gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man den Mikroorganismus gemäß Anspruch 11 kultiviert und die Telomerase isoliert.

Humane katalytische Telomerase-Untereinheit und deren diagnostische und therapeutische Verwendung

Z u s a m m e n f a s s u n g

Diese Erfindung betrifft die Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Proteinsequenz, die für die humane katalytische Telomerase-Untereinheit codiert. Darüberhinaus betrifft diese Erfindung Methoden, die eine pharmazeutische, diagnostische oder therapeutische Verwendung von diesem Gen/Protein beinhaltet, vor allem in der Behandlung von Krebs und Alterung.

Fig. 1

1 GCCAAGTTCC TGC ACTGGCT GATGAGTGTG TACGTCGTCG AGCTGCTCAG
51 GTCTTTCTTT TATGTCACGG AGACCACGTT TCAAAAGAAC AGGCTCTTTT
101 TCTACCGGAA GAGTGTCTGG AGCAAGTTGC AAAGCATTGG AATCAGACAG
151 CACTTGAAGA GGGTGCAGCT GCGGGACGTG TCGGAAGCAG AGGTCAGGCA
201 GCATCGGGAA GCCAGGCCCG CCCTGCTGAC GTCCAGACTC CGCTTCATCC
251 CCAAGCCTGA CGGGCTGCGG CCGATTGTGA ACATGGACTA CGTCGTGGGA
301 GCCAGAACGT TCCGCAGAGA AAAGAGGGCC GAGCGTCTCA CCTCGAGGGT
351 GAAGGCACTG TTCAGCGTGC TCAACTACGA GCGGGCGCG 389

Abb. 1

1 AKFLHWLMSV YVVELLSFF YVTETTFQKN RLFFYRKS VW SKLQSIGIRQ
61 HLKRVQLRDV SEAEVRQHRE ARPALLTSRL RFIPKPDGLR PIVNMDYVVG
101 ARTFRREKRA ERLTSRVKAL FSVLNYERA 129

Abb. 2

Fig. 2

Lipman-Pearson Protein Alignment

Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12

Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Consensus

PHTC.PRO P123.PRO P123.PRO Index Number Length Length

(2>124) (1>117) 31.5 4 6 123

PHTC.PRO	KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVVTETTFQKNRLFFYRKSVWSKLSQSIGIRQHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALTSRLR	↖10	↖20	↖30	↖40	↖50	↖60	↖70	↖80
	K:L:W:.. VV.L:R.FFYVTE			:::YRK::W.	:::I	:LK:	L:V E EV	:::LR	
P123.PRO	KLLRWIFEDLVVSLIRCFYVTEQOKSYSKYTYRKNWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVQEKV-EEWKKSGLGFAPGKLR	↖10	↖20	↖30	↖40	↖50	↖60	↖70	↖80
PHTC.PRO	FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA	↖90	↖100	↖110	↖120				
	:IPK ..:RPI M.: :LT:..K L S L								
P123.PRO	LIPKKTTFRPI--MTF--NKKIVNSDRKTTKLTNTKLLNSHMLKTL	↖80	↖90	↖100	↖110	↖120			

Fig. 3

Lipman-Pearson Protein Alignment

Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12

Seq1(1>150)

Seq2(1>150)

Similarity

Gap

Gap Consensus

P123.PRO

EST2P.PRO

Index

Number

Length

Length

(2>148) (1>146) 21.6 4 5 149

P123.PRO	LLRWIFEDLVVSLIRCFYVTEQQKSYSKYTYRKNWDVIMKMSIADLKKETLAEVQKEVEEWKSLGFA PGKLRIP	↖10	↖20	↖30	↖40	↖50	↖60	↖70	↖80
EST2P.PRO	..W:F:L:..I:FFYTE:..Y:R:..W:..I:K.L.E:..F:..K:R:IP	↖10	↖20	↖30	↖40	↖50	↖60	↖70	↖80
P123.PRO	FISWLFRLIPKIIQTFFCYCTEISSTVIVF-RHDTWNKLIITPFIVEYFKTYLVENNVCRNHNSTLSNFNHSMRIIP	↖10	↖20	↖30	↖40	↖50	↖60	↖70	↖80
EST2P.PRO	..W:F:L:..I:FFYTE:..Y:R:..W:..I:K.L.E:..F:..K:R:IP	↖10	↖20	↖30	↖40	↖50	↖60	↖70	↖80
P123.PRO	KKT--TFRPIMTFNKKIVNSDRKTTKLTNTKLLNSHLMLKTLKNRMFKDPFGFAVFNYYDDVMKKYEEFVC	↖90	↖100	↖110	↖120	↖130	↖140	↖150	
EST2P.PRO	KK:..FR I:..:..K:..:..L:L:N:..:F:..:..:..EF	↖90	↖100	↖110	↖120	↖130	↖140	↖150	
P123.PRO	KKSNNEFRIIAPCRGADEEEFTIYKENHKNAIQPTOKILEYLRNKR-PTSFT-KIYSPTQIADRIKEFKQ	↖80	↖90	↖100	↖110	↖120	↖130	↖140	
EST2P.PRO	..W:F:L:..I:FFYTE:..Y:R:..W:..I:K.L.E:..F:..K:R:IP	↖80	↖90	↖100	↖110	↖120	↖130	↖140	

Fig. 4

Lipman-Pearson Protein Alignment

Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12

Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Consensus
PHTC.PRO EST2P.PRO Index Number Length Length

(3>85) (1>80) 23.3 3 3 83

PHTC.PRO	FLHWLMSVYVVELLSFFYVTETTFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRDVSEAEVROHREARPALTSRLRF	↖10	↖20	↖30	↖40	↖50	↖60	↖70	↖80
EST2P.PRO	FISWLFRLIPKIIQTFFCYCTEIS-STVTIVYFRHDTWNKLITPFIVEYFKTY-LVE-NNVCRNHNSYTLNFNHSMRI	↖10	↖20	↖30	↖40	↖50	↖60	↖70	↖80
PHTC.PRO	IPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA	↖90	↖100	↖110	↖120				
EST2P.PRO	IPKKSNNEFRIIAIPCRGADEEEFTIYKENHKNAIQPTQKILEYLRN	↖80	↖90	↖100	↖110	↖120			

Fig. 6

Abb. 3	p123	447	LVVSLIRCFFYVTE	460
	est2p		LIPKIIQTFFYVTE	
	phTC		YVVELLRSFFYVTE	

Abb. 4	p123	512	GKLRLIPKKTT--FRPI	526
	est2p		SKMRIIPKKSNNFR-I	
	phTC:		SRLRFIPKPDG--LRPI	
	RT con		p-hh-h-K	hR-h

Fig. 7

